

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas utama dan unggulan dalam industri agribisnis dengan nilai ekonomi yang tinggi (Rizal *et al.*, 2024). Biji kakao berasal dari tanaman kakao yang diolah menjadi bahan baku dalam produksi cokelat dan berbagai produk olahan cokelat lainnya. Umumnya, biji kakao diolah menjadi produk setengah jadi (*intermediate*), berupa pasta kakao (*cacao liquor*), lemak kakao (*cacao butter*), dan bubuk kakao (*cacao powder*) serta menjadi produk akhir berupa cokelat batang dan olahan lainnya. Kualitas biji kakao menjadi faktor penting yang menentukan nilai jualnya di pasar internasional. Industri makanan dan minuman sebagai pengguna biji kakao terbesar telah menetapkan berbagai persyaratan yang selektif dalam aspek citarasa dan keamanan pangan. Persyaratan kualitas biji kakao di Indonesia telah diatur secara resmi dalam Standar Nasional Indonesia, yaitu SNI 2323:2008 yang menetapkan klasifikasi, syarat mutu umum dan khusus, serta kriteria, seperti kadar air, kadar biji berjamur, biji slaty, dan biji cacat. Namun, penerapan standar SNI masih menghadapi kendala di tingkat petani, sehingga kualitas biji kakao yang dihasilkan sangat rendah. Teknik pengolahan pascapanen yang umumnya dilakukan oleh petani untuk memproduksi biji kakao yaitu hanya dengan pengupasan dan pengeringan di bawah sinar matahari tanpa melalui proses fermentasi. Proses fermentasi dinilai membutuhkan waktu yang lebih lama, tenaga kerja, dan biaya yang lebih banyak, serta memerlukan peralatan tambahan (Sari *et al.*, 2025). Selain itu, masih kurangnya pengetahuan petani mengenai teknologi pengolahan pascapanen biji kakao. Hal ini mengakibatkan biji kakao yang dihasilkan tanpa melalui proses fermentasi akan terasa pahit dan sepat, serta tidak mengeluarkan aroma dan citarasa yang khas pada saat dilakukan proses pengolahan lebih lanjut, sehingga memengaruhi harga jual biji kakao.

Fermentasi adalah salah satu proses pascapanen yang berperan penting dalam pengolahan biji kakao untuk menghasilkan produk yang berkualitas. Proses fermentasi kakao umumnya dilakukan dengan metode tumpukan yang melibatkan penumpukan biji kakao dalam kotak kayu dalam jumlah yang besar selama 5-7 hari. Keberhasilan proses fermentasi biji kakao sangat ditentukan oleh tiga kelompok mikroba utama yaitu ragi, bakteri asam laktat (BAL), dan bakteri asam asetat (AAB) yang masing-masing memberikan kontribusi terhadap proses fermentasi (Rahayu *et al.*, 2021). Indikator utama keberhasilan proses fermentasi biji kakao yaitu terjadi pengurangan jumlah pulp, terhentinya proses perkecambahan yang menyebabkan kematian biji, pembentukan prekursor rasa dan aroma, dan penurunan kadar air, serta dapat mengurangi rasa pahit dan sepat pada biji kakao. Terdapat dua metode fermentasi kakao yang umumnya digunakan, yaitu fermentasi spontan dan fermentasi terkontrol. Fermentasi spontan adalah fermentasi yang terjadi secara alami yang bergantung pada karakteristik substrat, varietas kakao, kondisi lingkungan fermentasi, dan kandungan mikroba yang terbentuk secara alami, serta memiliki waktu fermentasi yang heterogen.

Fermentasi terkontrol adalah fermentasi yang dilakukan dengan penambahan kultur starter dalam jumlah tertentu sehingga faktor-faktor yang memengaruhi fermentasi, seperti suhu dan pH dapat diatur dan dikendalikan untuk memperoleh kualitas akhir yang lebih baik dan konsisten (Vuyst dan Leroy, 2020).

Mikroorganisme memainkan peran penting dalam fermentasi biji kakao dengan mendorong perubahan biokimia yang membentuk rasa dan kualitas cokelat. Aktivitas ragi berlangsung pada fase awal fermentasi (0-24 jam) dengan memecah karbohidrat dalam pulp kakao menjadi etanol dan karbondioksida serta menunjukkan aktivitas pektinolitik untuk mendegradasi pektin dalam pulp kakao. Bakteri asam laktat (BAL) akan muncul pada 12 hingga 48 jam fermentasi yang juga secara bersamaan akan mengonsumsi karbohidrat (terutama fruktosa) dan memecah protein menjadi peptida dan asam amino sehingga menghasilkan asam laktat, asam asetat, etanol, dan karbondioksida yang memengaruhi perkembangan prekursor rasa dan aroma biji kakao (Díaz-Muñoz dan Vuyst, 2022). Selama fase ini, produksi asam laktat oleh BAL sangat penting dalam menurunkan pH pulp yang menyebabkan kematian biji dan menciptakan kondisi yang optimal untuk pertumbuhan bakteri asam asetat. Selanjutnya, pada tahap akhir proses fermentasi (72-96 jam) bakteri asam asetat (AAB) akan tumbuh subur akibat ketersediaan oksigen. Bakteri ini berperan pada produksi asam asetat yang memberikan citarasa khas dan seimbang pada profil rasa cokelat (Pokharel, 2023). Kehadiran spesies ragi, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat dalam fermentasi biji kakao memengaruhi pemecahan gula, protein, dan karbohidrat sehingga menghasilkan senyawa yang memperkaya kompleksitas citarasa biji kakao.

Penggunaan kultur starter mikroba telah menjadi hal yang krusial dalam fermentasi biji kakao yang memberikan berbagai keuntungan. Penelitian tentang fermentasi biji kakao dengan menggunakan berbagai jenis kultur starter telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti, seperti Marwati *et al.*, (2024) yang menggunakan kultur tunggal *Lactobacillus plantarum*, Sabahannur dan Syam, (2025) yang menggunakan kultur tunggal *Saccharomyces cerevisiae*, dan Falconi *et al.*, (2023) yang menggunakan kultur campuran *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *L. plantarum*, dan *Acetobacter ghanensis*. Setiap jenis mikroba memiliki kontribusi yang berbeda terhadap fermentasi dan karakteristik akhir biji kakao. Bakteri asam laktat menjadi kultur starter yang sangat potensial untuk fermentasi biji kakao karena berkontribusi signifikan pada profil rasa, aroma, dan kualitas keseluruhan produk cokelat yang dihasilkan (Campos *et al.*, 2025). Selain itu, penggunaan bakteri asam laktat (BAL) sebagai kultur starter dapat meningkatkan kinerja fermentasi biji kakao dengan mengendalikan dan menyeimbangkan populasi berbagai mikroorganisme yang terlibat, sehingga proses fermentasi menjadi lebih terkontrol dan menghasilkan biji kakao dengan kualitas fisik yang lebih baik (Marwati *et al.*, 2024).

Bakteri asam laktat juga dikenal memiliki toleransi yang baik terhadap kondisi lingkungan fermentasi yang beragam. Bakteri ini memiliki kemampuan dalam menghasilkan asam laktat secara efektif, yang berkontribusi terhadap penurunan

pH lingkungan fermentasi sehingga menciptakan kondisi yang optimal bagi mikroorganisme lain yang mendukung proses fermentasi. Penggunaan bakteri asam laktat khususnya *Lactobacillus plantarum* sebagai kultur starter dalam fermentasi biji kakao dapat meningkatkan konsistensi dan mutu hasil fermentasi, seperti warna, tekstur, dan profil rasa, sehingga secara signifikan dapat meningkatkan nilai jual biji kakao. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian fermentasi biji kakao dengan penambahan *Lactobacillus plantarum* sebagai kultur starter, yang diaplikasikan pada waktu yang berbeda (0 jam fermentasi dan pada 48 jam fermentasi) untuk mengetahui pengaruhnya terhadap karakteristik fisikokimia dan citarasa biji kakao fermentasi yang dihasilkan.

1.2 Rumusan Masalah

Biji kakao kering menjadi bahan baku utama dalam pembuatan produk cokelat dan berbagai olahan cokelat lainnya. Biji kakao berkualitas tidak hanya ditentukan oleh varietas dan lingkungan tumbuh tanaman kakao, namun juga dipengaruhi oleh pengolahan pascapanen biji kakao yang dilakukan secara tepat. Proses fermentasi menjadi langkah penting dalam pengolahan pascapanen biji kakao, terutama dalam meningkatkan mutunya. Namun, penerapan fermentasi yang efektif masih menjadi tantangan, khususnya dalam pemanfaatan kultur mikroba yang belum sepenuhnya dioptimalkan. Faktor-faktor seperti jenis mikroba dan metode fermentasi yang digunakan, serta kondisi lingkungan fermentasi sangat memengaruhi keberhasilan fermentasi yang berdampak pada kualitas akhir biji kakao. Salah satu kelompok mikroba yang berperan penting dalam fermentasi biji kakao adalah bakteri asam laktat, yang berkontribusi terhadap pembentukan senyawa-senyawa volatil dalam pengembangan aroma dan citarasa biji kakao. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui peran bakteri asam laktat dalam proses fermentasi untuk meningkatkan mutu biji kakao.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini, yaitu sebagai berikut:

1. Untuk mengevaluasi pengaruh penambahan starter cair *Lactobacillus plantarum* terhadap karakteristik fisikokimia dan profil rasa biji kakao.
2. Untuk mengidentifikasi perlakuan terbaik untuk meningkatkan kualitas biji kakao.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu diharapkan dapat memberikan informasi terkait pengolahan pascapanen biji kakao dengan fermentasi menggunakan kultur mikroba sehingga dapat mempercepat proses fermentasi dan menghasilkan biji kakao yang berkualitas lebih baik.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 hingga Februari 2025, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan, Laboratorium Kimia Analisa dan Pengawasan Mutu Pangan, Laboratorium Pengembangan Produk, dan Laboratorium Pengolahan Pangan, Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, batang pengaduk, *bulb*, bunsen, blender, botol vial, botol kaca, cawan petri, *centrifuge*, *centrifuge tube*, corong, corong *Buchner*, desikator, *ependorf tube*, erlenmeyer, erlenmeyer *Buchner*, gelas kimia, gelas ukur, gegap, *hot plate*, *hand refractometer*, inkubator, jarum ose, *Laminar Air Flow* (LAF), labu ukur, mikropipet, *magnetic stirrer*, *microplate reader*, *microplate*, *mikrotip*, *moisture meter* (Digi Nor), oven, pipet tetes, pipet volume, pisau, pinset, pH meter digital, pompa vakum, rak tabung reaksi, *rotary evaporator*, refrigerator, spektrofotometer UV-VIS, sonikator, sendok tanduk, tabung reaksi, timbangan analitik, vorteks, wadah fermentasi, dan wadah pengeringan.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah kakao matang yang berasal dari perkebunan rakyat di Kabupaten Enrekang, Sulawesi Selatan, starter cair *Lactobacillus plantarum*, daun pisang, akuades, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), asam galat, buffer pH 4,01 dan 7,01, dimetilsulfoksida (DMSO), etanol, fero sulfat (FeSO_4), folin-ciocalteu, glukosa, heksan, kalium karbonat (Na_2CO_3), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), larutan fisiologis 0,85%, magnesium sulfat (MgSO_4), media MRS *Broth*, metanol, pepton, kertas saring, aluminium foil, parafilm, plastik bening, plastik *wrap*, tisu, spritus, dan kapas.

2.3 Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) satu faktorial, yang mencakup 4 perlakuan dengan masing-masing tiga kali pengulangan. Adapun perlakuan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu:

A1 = tanpa fermentasi (kontrol)

A2 = fermentasi spontan

A3 = 1% *Lactobacillus plantarum* ditambahkan mulai 0 jam fermentasi

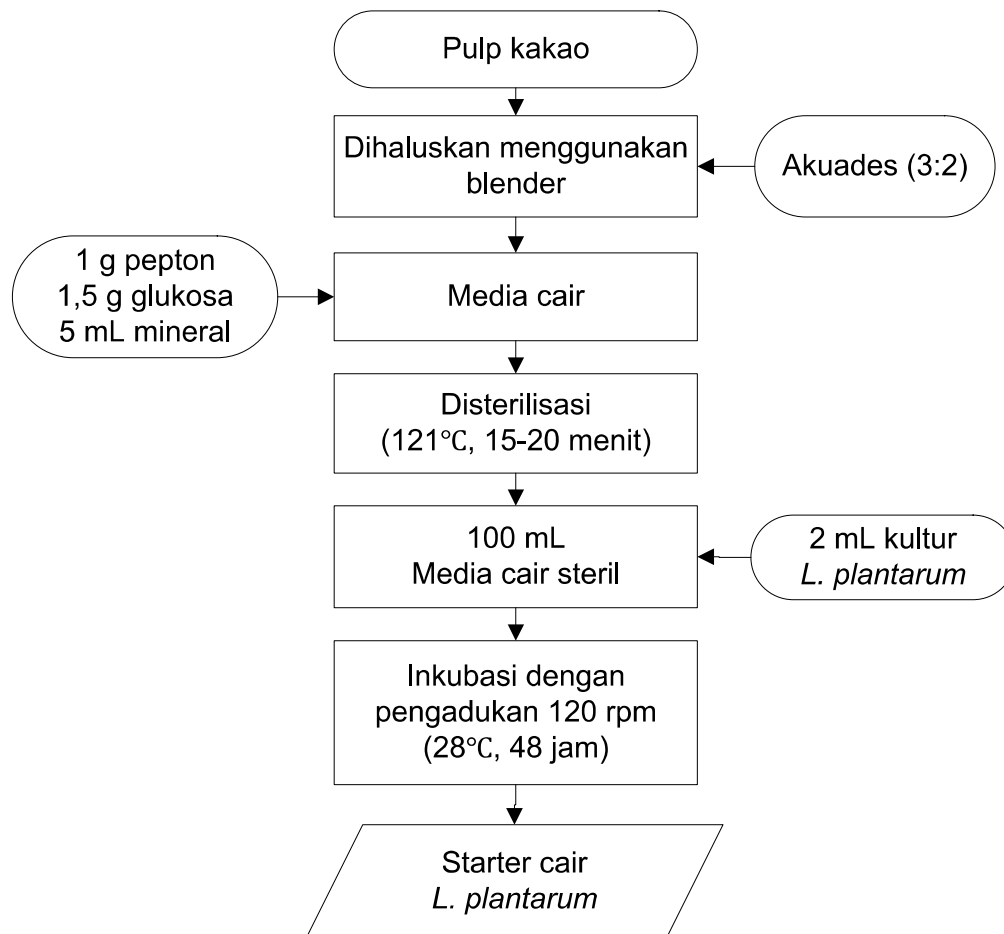
A4 = 1% *Lactobacillus plantarum* ditambahkan mulai 48 jam fermentasi

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pembuatan Starter Cair

Pembuatan starter *Lactobacillus plantarum* dilakukan dengan mengacu pada penelitian Falconí *et al.*, (2023) yang telah dimodifikasi. Kultur murni *Lactobacillus plantarum* yang telah diinokulasikan pada media MRS *Broth* kemudian ditumbuhkan dalam media cair tanpa agar. Pembuatan media cair

dilakukan dengan biji kakao dipisahkan dari pulpnya dan ditambahkan dengan akuades (3:2), kemudian diblender. Selanjutnya, media cair ditambahkan dengan 1 gram pepton, 1,5 gram glukosa, dan 5 mL larutan mineral. Larutan mineral dibuat dengan melarutkan 0,5 gram MgSO_4 , 0,5 gram KH_2PO_4 , dan 0,01 gram FeSO_4 dalam 100 mL akuades. Setelah itu, media cair disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit. BAL dipipet sebanyak 2 mL kemudian ditumbuhkan dalam 100 mL media cair pada suhu 28°C dengan pengadukan pada kecepatan 120 rpm selama 48 jam. Setelah itu, starter cair *Lactobacillus plantarum* siap digunakan untuk fermentasi biji kakao. Diagram alir proses pembuatan starter cair dapat dilihat pada **Gambar 1**.

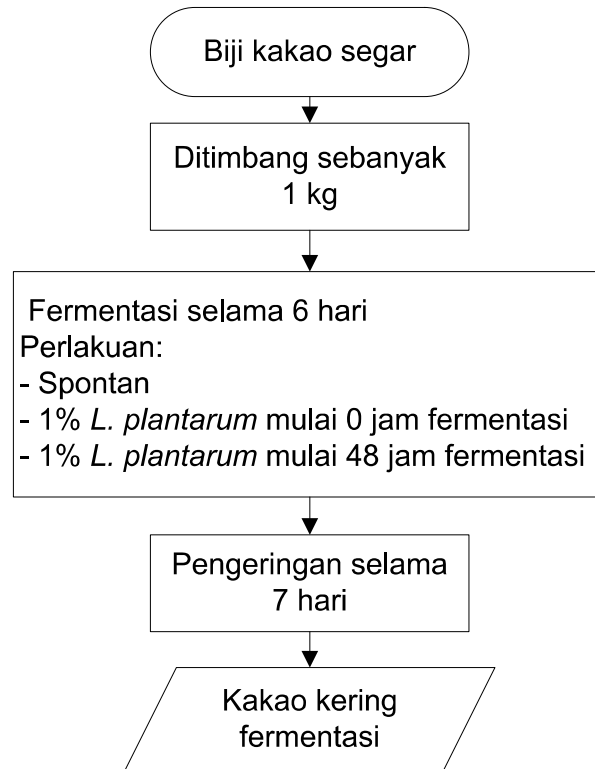


Gambar 1. Diagram Alir Proses Pembuatan Starter Cair

2.4.2 Fermentasi Biji Kakao

Fermentasi biji kakao dilakukan dengan mengacu pada penelitian Bobiles *et al.*, (2022) yang telah dimodifikasi. Buah kakao disortir terlebih dahulu untuk menghilangkan buah yang belum matang, busuk, dan rusak akibat serangan hama dan jamur. Setelah itu, biji kakao segar yang diperoleh ditimbang sebanyak masing-masing 1 kg ke dalam wadah fermentasi yang telah dilapisi dengan daun pisang. Selanjutnya, biji kakao diberikan perlakuan penambahan kultur starter dan difermentasi selama 6 hari berturut-turut. Pengadukan dilakukan setiap 48 jam,

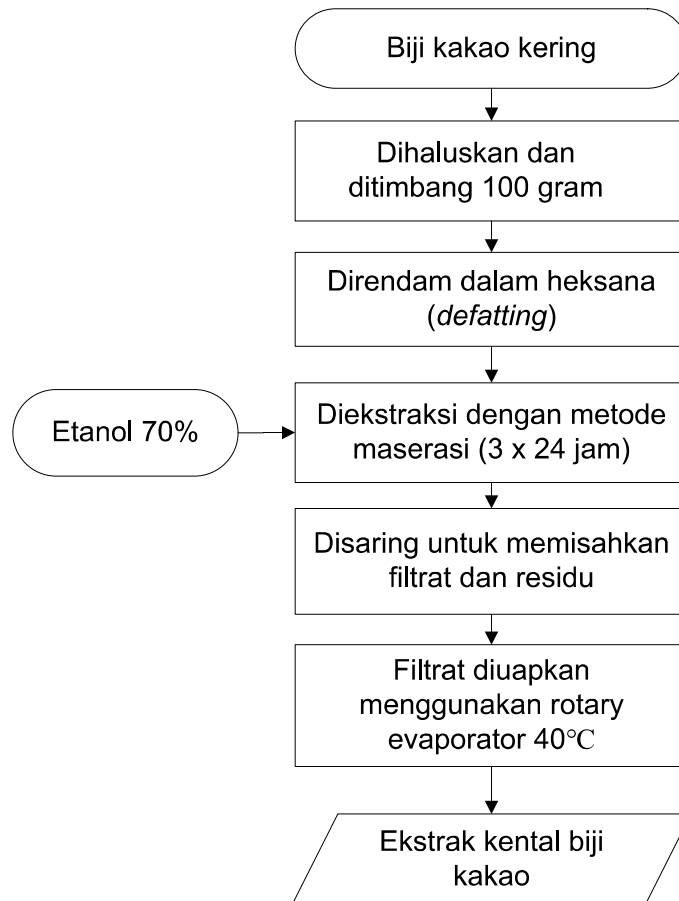
sedangkan pengukuran pH dan suhu dilakukan setiap 24 jam secara berkala. Setelah 6 hari fermentasi dihentikan, biji kakao kemudian dikeringkan selama 7 hari hingga mencapai kadar air 7,5%. Diagram alir proses fermentasi biji kakao dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Diagram Alir Proses Fermentasi Biji Kakao

2.4.3 Ekstraksi Biji Kakao

Ekstraksi biji kakao dilakukan dengan mengacu pada penelitian Aunillah *et al.*, (2021) yang telah dimodifikasi. Biji kakao kering yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 100 gram dan direndam dalam heksana untuk dihilangkan lemaknya (*defatting*). Selanjutnya, bubuk kakao yang telah dihilangkan lemaknya kemudian dimaserasi dengan penambahan etanol 70% (1:4). Ekstraksi dengan metode maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dengan wadah tertutup pada suhu ruang. Maserasi pada hari ketiga dilanjutkan dengan menggunakan ultrasonik selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk memperoleh ekstrak kental. Diagram alir proses ekstraksi biji kakao dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Diagram Alir Proses Ekstraksi Biji Kakao

2.5 Parameter Pengujian

2.5.1 Kadar Air

Pengujian kadar air biji kakao dilakukan dengan menggunakan *moisture meter*. Alat dikalibrasi terlebih dahulu agar hasil pengukuran sesuai dengan standar yang diinginkan. Selanjutnya, biji kakao diambil secara acak dan ditempatkan pada alat pengukur kadar air digital (*Digi Nor*) hingga penuh, kemudian dilakukan pembacaan dan hasil akan muncul secara langsung pada layar digital.

2.5.2 Jumlah Biji per 100 gram

Penentuan jumlah biji per 100 gram dilakukan dengan mengacu pada penelitian Ngatirah *et al.*, (2024). Biji kakao kering ditimbang sebanyak 100 gram, selanjutnya dihitung jumlah biji kakao yang terdapat dalam 100 gram tersebut. Setelah itu, ditentukan *grade* atau golongan berdasarkan jumlah bijinya yang telah ditentukan dalam standar SNI 2323:2008. Berdasarkan berat bijinya, mutu biji kakao dikategorikan kedalam 5 golongan sebagai berikut:

- AA = maksimum 85 biji per 100 gram
- A = 86 – 100 biji per 100 gram
- B = 101 – 110 biji per 100 gram
- C = 111 – 120 biji per 100 gram
- S = lebih dari 120 biji per 100 gram

2.5.3 pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter digital yang mengacu pada penelitian Haruna *et al.*, (2024) yang telah dimodifikasi. Biji kakao yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 1 gram dan ditambahkan dengan 9 mL akuades panas, kemudian diaduk selama 1 menit. Selanjutnya, sampel didiamkan dan didinginkan hingga mencapai suhu 23-25°C. Setelah itu, diukur pH nya menggunakan pH meter.

2.5.4 Total Padatan Terlarut (°Brix)

Pengujian total padatan terlarut (°Brix) dilakukan dengan menggunakan *handrefractometer* digital yang mengacu pada penelitian López-Hernández *et al.*, (2021). Biji kakao yang telah dihaluskan, ditimbang sebanyak 1 gram dan dilarutkan dengan 5 mL akuades. Selanjutnya, sampel diletakkan sebanyak 2-3 tetes pada permukaan prisma, lalu ditutup. Setelah itu, prisma diarahkan ke sumber cahaya dan terlihat batas daerah berwarna biru dan putih yang menunjukkan nilai brix total padatan terlarut.

2.5.5 Intensitas Warna

Pengujian intensitas warna dilakukan dengan menggunakan instrumen *colorimeter* yang mengacu pada penelitian Saputro *et al.*, (2021). Biji kakao yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam plastik cetik hingga penuh. Selanjutnya, instrumen *colorimeter* dikalibrasi dan dilakukan pembacaan dengan parameter warna dinyatakan dalam sistem CIELAB. Nilai L* menunjukkan tingkat kecerahan (terang-gelap), a* menunjukkan tingkat warna merah hingga hijau, dan b* menunjukkan tingkat warna biru hingga kuning.

Keterangan:

L* = kecerahan 0 (hitam)-100 (putih)

a* = merah (0-80) hijau (0-(-80))

b* = kuning (0-70) biru (0-(-70))

2.5.6 Citarasa

Pengujian organoleptik dilakukan oleh panelis terlatih dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao (Puslitkoka) yang menilai parameter pengujian rasa dan aroma.

2.5.7 Aroma

Pengujian organoleptik aroma dilakukan dengan metode hedonik yang mengacu pada penelitian Pakpahan *et al.*, (2025). Panelis sebanyak 25 orang diminta untuk menilai preferensi mereka terhadap aroma biji kakao dan mengisi kuisioner uji organoleptik berdasarkan tingkat kesukaan. Adapun skala yang digunakan sebagai berikut:

1 = sangat tidak suka

6 = suka

2 = tidak suka

7 = sangat suka

3 = agak tidak suka

4 = biasa saja

5 = agak suka

2.5.8 Indeks Fermentasi

Pengujian indeks fermentasi dilakukan dengan mengacu pada penelitian Pita-Garcia *et al.*, (2025) yang telah dimodifikasi. Biji kakao yang telah dihaluskan dan dihilangkan lemaknya ditimbang sebanyak 0,05 gram dan diekstraksi dengan 5 mL larutan metanol:HCl (97:3). Selanjutnya, sampel dihomogenkan dan disimpan pada suhu 8°C selama 24 jam. Setelah itu, ekstrak disaring dan dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 460 dan 530 nm. Nilai indeks fermentasi ditentukan dengan perbandingan antara absorbansi 460 nm dan 530 nm. Adapun rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\text{Indeks Fermentasi (FI)} = \frac{\text{penyerapan 460 nm}}{\text{penyerapan 530 nm}}$$

2.5.9 Total Fenolik

Pengujian total fenolik dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu dengan menggunakan asam galat sebagai standar, mengacu pada penelitian Raju *et al.*, (2024) yang telah dimodifikasi.

a. Pembuatan Larutan Standar

Asam galat ditimbang sebanyak 0,01 g dan dilarutkan dalam 10 mL etanol PA 70%, sehingga diperoleh larutan baku asam galat dengan konsentrasi 1.000 µg/mL.

b. Pembuatan Kurva Standar

Pembuatan kurva standar dilakukan dengan mengencerkan larutan baku asam galat 1.000 µg/mL menggunakan etanol PA 70%. Konsentrasi yang dibuat untuk kurva kalibrasi, yaitu 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL, 250 µg/mL, 300 µg/mL, dan 350 µg/mL. Selanjutnya, masing-masing konsentrasi asam galat dipipet sebanyak 20 µL kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1,58 mL aquabides, dan 100 µL reagen Folin–Ciocalteu. Selanjutnya, larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit dalam ruang gelap. Setelah itu, ditambahkan 300 µL natrium karbonat (Na₂CO₃) 10%. Selanjutnya, larutan dihomogenkan dan diinkubasi kembali selama 2 jam dalam kondisi gelap. Larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang 782 nm menggunakan spektrofotometer Uv – Vis.

c. Pengujian Total Fenolik

Ekstrak biji kakao ditimbang sebanyak 0,01 g dan dilarutkan dalam 7 mL etanol PA 70%. Selanjutnya, sampel dipipet sebanyak 20 µL kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1,58 mL aquabides, dan 100 µL reagen Folin–Ciocalteu. Selanjutnya, larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit dalam ruang gelap. Setelah itu, ditambahkan 300 µL natrium karbonat (Na₂CO₃) 10%. Selanjutnya, larutan dihomogenkan dan diinkubasi kembali selama 2 jam dalam kondisi gelap. Absorbansi sampel diukur menggunakan Spektrofotometer Uv – Vis pada panjang gelombang 782 nm. Total fenolik dihitung dengan persamaan kurva standar asam galat ($y = 0,0011x - 0,0092$), dimana x sebagai

konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan y sebagai absorbansi sampel. Adapun persamaan yang digunakan sebagai berikut:

$$x = \frac{y + 0,0092}{0,0011} \times \text{FP}$$

Keterangan:

x = total fenolik ($\mu\text{g/mL}$)

y = absorbansi sampel

FP = faktor pengenceran

Satuan total fenolik yang diperoleh, yaitu $\mu\text{g/mL}$ kemudian dikonversi kedalam satuan mg GAE/g dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Total Fenolik} = \frac{\text{konsentrasi total fenolik sampel (mg)}}{\text{berat sampel setelah evaporasi (gram)}}$$

2.5.10 Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode *mikroplate reader* dengan menggunakan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) sebagai indikator radikal bebas mengacu pada penelitian Wiliantari *et al.*, (2022) yang telah dimodifikasi.

a. Pembuatan Larutan DPPH

Bubuk DPPH ditimbang sebanyak 0,004 g dan dilarutkan dengan 25 mL metanol PA dalam labu ukur. Setelah itu, larutan DPPH dihomogenkan dan dibungkus dengan *aluminium foil* agar tidak teroksidasi oleh cahaya.

b. Pembuatan Larutan Sampel

Ekstrak biji kakao ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan 1 mL DMSO sehingga terbentuk larutan induk sampel dengan konsentrasi 10.000 ppm. Selanjutnya, konsentrasi diturunkan hingga 1000 ppm dengan melarutkan 100 μL larutan induk dengan 900 μL metanol PA. Setelah itu, dibuat larutan uji dengan konsentrasi berbeda, yaitu 10 ppm, 15 ppm, 25 ppm, 30 ppm, dan 50 ppm.

c. Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan masing-masing larutan uji dipipet sebanyak 100 μL kedalam setiap *well mikroplate* dan kemudian ditambahkan larutan DPPH sebanyak 100 μL . Selanjutnya, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit di ruang gelap. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan *microplate reader*. Aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan penurunan intensitas warna larutan DPPH, menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Setelah diperoleh nilai persentase penghambatan dari masing-masing konsentrasi, selanjutnya ditentukan persamaan regresi linier ($y = a + bx$), dimana x sebagai konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan y sebagai persentase penghambatan (%).

2.6 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini akan dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji lanjutan menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Analisis data dilakukan dengan menggunakan Microsoft Excel dan SPSS.